UNIVERSITÉ DE LAUSANNE - FACULTÉ DE MÉDECINE
CLINIQUE INFANTILE UNIVERSITAIRE
Directeur: Professeur L.-S. Prod'hom

La réduction du nitrobleu de tetrazolium par les granulocytes dans la période néonatale

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de docteur en médecine

par

Manuel MORO SERRANO

Médecin diplômé de l'Université de Madrid

Originaire de Madrid (Espagne)

Lausanne
Multi-Office
1976

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE - FACULTÉ DE MÉDECINE
CLINIQUE INFANTILE UNIVERSITAIRE
Directeur: Professeur L.-S. Prod'hom

La réduction du nitrobleu de tetrazolium par les granulocytes dans la période néonatale

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de docteur en médecine

par

Manuel MORO SERRANO

Médecin diplômé de l'Université de Madrid
Originaire de Madrid (Espagne)

Lausanne
Multi-Office
1976

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

FACULTÉ DE MÉDECINE

Le Conseil de la faculté de médecine de l'Université de Lausanne, après avoir pris connaissance des rapports favorables de MM. les professeurs

L.-S. PROD'HOM

et M. le Dr F. CLEMENT Privat-Docent

et sans se prononcer sur les opinions du candidat, autorise l'impression de la thèse intitulée :

La réduction du nitrobleu de tetrazolium par les granulocytes dans la période néonatale

présentée par Monsieur

Manuel MORO SERRANO

Médecin diplômé de l'Université de Madrid (Espagne)

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN MÉDECINE

Lausanne, le 18 mars 1976

Le Doyen :
Prof. G. Candardjis

UNIV. LEIDEN BIBL.

A mes parents.

A M. le Professeur L.S. Prod'hom qui m'a appris que méthodologie et riguer doivent être la base de toute activité médicale.

- I. INTRODUCTION

- II. MATERIEL ET METHODES :

1. Techniques
   1.1. Test au N.B.T.
   1.2. Test au latex
2. Réactifs
3. Population
   3.1. Populations témoins
      3.1.1. Adultes
      3.1.2. Enfants
   3.2. Population faisant l'objet de l'étude
      3.2.1. Nouveaux-nés
      3.2.2. Prématurés
4. Statistique et expression des résultats

- III. RESULTATS

1. Chez l'adulte
2. Chez les enfants âgés de plus de 6 mois
3. Conclusions
4. Chez les nouveaux-nés
5. Chez les prématurés
   5.1. Non infectés
   5.2. Infectés
   5.3. Relations entre test au N.B.T. conditions cliniques et examens paracliniques.

6. Test au N.B.T. après stimulation au latex.

- IV. DISCUSSION
- V. RESUME
- VI. BIBLIOGRAPHIE

Abréviations :

N.B.T.	: Nitrobleu de tétrazolium
P.N.	: Polynucléaires
N.N.	: Nouveaux-nés
F.S.C.	: Formule sanguine complète
A.K.	: Adénylate-kinase
P.K.	: Pyruvate-kinase
N.A.D.H.	: Adénine-diphospho-nucléotide
A.T.P.	: Adénosine-triphosphate
S.D.	: Déviation standard

I. INTRODUCTION .

Les infections néonatales constituent un problème grave en raison de leur grande fréquence et de leur mortalité élevée. Selon les divers centres, la septicémie néonatale se présente avec une fréquence qui oscille entre 1/1000 et 1/1.600 et est accompagnée d'une mortalité qui varie de 10 à 22 % (35).

Cette haute mortalité et cette grande incidence des infections chez le nouveau-né sont déterminées par une pluralité de faits entre lesquels deux se distinguent : le passage du fœtus d'un milieu stérile à un milieu contaminé et, d'autre part, des mécanismes de défense de l'enfant devant l'agression bactérienne, pendant les premiers moments de la vie.

L'immunité spécifique et non spécifique du nouveau-né n'est pas connue dans toute sa dimension. L'immunité humorale se caractérise par un déficit de la Ig M et de la Ig A. Toutes les autorités reconnaissent que cette déficience de Ig M est la cause du plus grand nombre et de la plus grande gravité des infections par germes gramnégatifs pendant la période périnatale. En ce qui concerne l'immunité cellulaire, le nouveau-né présente une réactivité du lymphocyte T normale, si on le compare à l'adulte (30)

L'immunité cellulaire non spécifique et plus concrètement la phagocytose de la part des P.N. comporte une série de mécanismes qui vont du chimiotactisme jusqu'à la destruction de la bactérie (8, 19, 24, 34). Le nouveau-né se caractérise par un chimiotactisme réduit tant par des facteurs sériques que par des facteurs propres au P.N. (23,37). La capacité phagocytaire des P.N. pendant la période néonatale peut s'explorer comme en d'autres moments de la vie, en étudiant

le métabolisme des granulocytes, leur pouvoir bactéricide et aussi avec le test du N.B.T.

Le métabolisme des granulocytes a été étudié par une série de méthodes parmi lesquelles on distingue : mesure de la consommation d'oxygène, de la production de CO_2 à partir du glucose 1-C.14, détermination de la production d'acide lactique, de la consommation de glucose et de la captation d'inuline 14-C (18, 20, 32).

Le pouvoir bactéricide des P.N. peut s'explorer au moyen de la phagocytose des bactéries tuées par la chaleur (3,9), des levures (4), de candida albicans (13, 14, 31) etc. Mais toutes ces méthodes sont d'une grande difficulté technique et, pour cela, elles ne sont pas applicables dans la routine d'un laboratoire clinique. C'est le mérite de PARK et coll. d'avoir mis au point un test simple et rapide permettant d'évaluer l'activité phagocytaire globale des P.N. : c'est le test de réduction du nitrobleu de tétrazolium (26, 29).

Le test au N.B.T. est un test histochimique : il consiste à faire phagocyter un sel de tetrazolium d'une couleur jaune pâle par un P.N. ; lors de la digestion intracellulaire, le sel est réduit, prenant une coloration bleu-noir de formazan. Ce changement de coloration est très facile à observer par l'examen microscopique des P.N. ayant phagocyté le N.B.T. Les P.N. ayant pris et réduit le colorant sont appelés N.B.T. positifs. Les résultats de ce test sont exprimés par le nombre de granulocytes N.B.T. positifs pour 100 P.N. examinés. Chez l'adulte à l'état normal non infecté, on rencontre entre 1 et 8 % de granulocytes N.B.T. positifs.

En pratiquant le test au N.B.T. chez les sujets ayant une infection bactérienne prouvée, PARK et coll. démontrent que

le pourcentage de granulocytes N.B.T. positifs était fortement élevé chez ces sujets par rapport à une population témoin (Adulte sain : 8 %, sujet avec méningite bactérienne : 46 %. Ces résultats sont confirmés ultérieurement par plusieurs auteurs (6, 10, 11, 17, 22, 36); actuellement, le test au N.B.T. est utilisé sur une large échelle dans le diagnostic différentiel des désordres fébriles. Par la suite BAEHNER et NATHAM (1) montrent à l'aide d'un test au N.B.T. modifié que chez les sujets atteints de granulomatose létale héréditaire, les P.N. ne réduisent pas le N.B.T. en raison d'un déficit dans le mécanisme d'oxydo-réduction intracellulaire. Les mêmes auteurs (2) démontrent par ailleurs que l'incubation in vitro des P.N. avec des bactéries ou avec des particules de latex accélère le métabolisme leucocytaire, phénomène qui s'accompagne d'une augmentation du nombre de P.N. N.B.T positifs. Cette observation est à la base du test de stimulation au latex.

Vu la fréquence et la gravité des infections bactériennes pendant la période néonatale, il semblait judicieux d'évaluer le pouvoir phagocytaire des P.N. du N.N. et plus particulièrement, d'étudier le test au N.B.T. aussi bien chez les N.N. que chez le prématuré. Plusieurs auteurs (5, 9, 17, 18, 25, 28) ont rapporté des résultats contradictoires, mais vu l'importrance et la difficulté du diagnostic précoce de l'infection néonatale, il a semblé utile de reprendre ces travaux et d'étudier les tests au N.B.T. chez des N.N. prématurés et non, infectés et non infectés, plus particulièrement à des âges postnataux bien précis.

II. MATERIEL ET METHODES.

1. Techniques employées.

1.1. Test au N.B.T. ou test de réduction du nitrobleu de tétrazolium.

La technique consiste à prélever 2 ml. de sang sur 0,4 ml. de citrate de sodium (20 %). Après la prise de sang, on centrifuge à 1000 t/m. pendant dix minutes afin d'obtenir une couche leucocytaire, le "buffy coat",. Simultanément, on centrifuge une solution de N.B.T. à 10 % à la même vitesse et pendant le même temps. Après centrifugation, le sérum surnageant s'enlève délicatement à l'aide d'une pipette Pasteur siliconée, on prélève trois gouttes de cette couche leucocytaire pour les déposer ensuite sur une cellule à cavité siliconée. On y ajoute trois gouttes de la solution finale de N.B.T. 0,1 % et on mélange le tout avec une baguette. On introduit la cellule dans une boîte de Petri humide et on dépose l'ensemble dans l'étuve à 37 C. pendant 15 minutes, puis on laisse reposer le tout pendant 15 autres minutes à la température ambiante.

A l'aide d'un capillaire, on prélève la couche leucocytaire sédimentée en présence de N.B.T. et on l'étale sur une lamelle comme pour un frottis sanguin.

Les frottis sont colorés avec la solution de May-Grünwald-Giemsa. Le comptage des P.N. se fait par une même personne; les résultats sont exprimés par le nombre des granulocytes N.B.T. positifs. Pour chaque test, 500 granulocytes ont été comptés. Durée du test : 50 minutes.

1.2. Test au N.B.T. après stimulation au latex.

Ce test permet de déterminer quelle est la capacité maximale de réduction du N.B.T. par les P.N.
L'extraction de sang et la préparation de la solution du N.B.T. se réalise de la même manière que pour un test de N.B.T. simple.

La technique de ce test consiste à mélanger dans un tube de plastique 3mg.de NADPH avec 0,35 ml. de sérum humain, auxquels on ajoute 0.05 ml. de glucose à 3,2 g % et 0,10 ml. de solution de N.B.T. Ce contenu se mélange bien pendant 2 minutes pour ajouter ensuite 3 gouttes de la couche leucocytaire et 0,015 ml. de particules de latex.

Finalement, le tube se met au bain-marie à 37º pendant 15 minutes, et est centrifugé ensuite à 1000 tours/minute pendant 10 minutes.

Avec une pipette Pasteur siliconée, on retire délicatement le surnageant pour finir par prendre la couche leucocytaire sédimentée qu'on étale sur une lamelle comme pour une répartition de sang. La coloration des frottis se fait avec la solution de May-Grümwald-Giemsa et non pas avec du vert de méthylène (31). Les résultats s'expriment par le nombre de de granulocytes qui ont phagocyté le N.B.T. et les particules de latex pour chaque centaine de granulocytes comptés. Le comptage de P.N. se fait par une même personne; pour chaque test, 500 granulocytes ont été comptés.

2. Réactifs.

2.1. Nitrobleu de tétrazolium N.B.T., colorant Sigma Co. Grade III. Préparation d'une solution mère du N.B.T. à 0,2 % dans de

l'eau physiologique. La solution finale 0,1 % s'obtient en mélangeant (1 : 1) une part d'eau physiologique tamponnée au phosphate (pH = 7,2) avec une part de solution mère du N.B.T.

2.2. Citrate de sodium.

2.3. N.A.D.P.H Beta nicotidamide-adénine-dinicléotide. Boehringer Mannheim.

2.4. Latex. Bacto latex 0.81 (Difco Laboratories)

2.5. Sérum humain

2.6. Glucose à 3,2 gr. %

2.7. Solution de silicone dans l'éther de pétrole à 2 %.

2.8. Autres : Eau physiologique, May-Grünwald, Giemsa, tampon de Weiss.

3. Population.

Deux populations ont été étudiées :

3.1. Popoulation témoin comprenant des adultes (3.1.1.) des enfants de plus de 6 mois d'âges (3.1.2.) sans et avec infection bactérienne prouvée.

3.2. Population néonatale, objet de l'étude, comprenant 20 N.N. à terme (durée de grossesse 260 jours et plus) et 30 N.N. prématurés (durée de grossesse 259 jours et moins).

3.1. Populations témoins.

3.1.1. Adultes.

Cette population comporte 30 adultes sains dont le sang a été fourni par le Centre de Transfusion Sanguine de Lausanne (Dir. Dr. Wuilleret). Sur 20 de ces sujets, le test au N.B.T. a été fait parallèlement sur du sang natif et sur du sang citraté. Il était important de rechercher l'effet du citrate de sodium sur l'activité digestive intracellulaire des P.N. En effet, selon certains auteurs le citrate de sodium inhiberait la phagocytose des bactéries (3). D'autres part, une activation du test au N.B.T. a été décrite à la suite de l'emploi d'héparine (18).

Pour étudier ces faits, on réalisa des prises chez 20 adultes sains auxquels on préleva 4 ml. de sang; 2 ml. étaient mis dans un tube contenant 0.4 ml. de citrate de sodium et le reste dans un autre tube qui ne contenait aucun coagulant. Les deux tubes se centrifugeaient pendant 10 minutes, receuillant ensuite 3 gouttes de couche leucocy-

taire qui se mélangeaient à trois gouttes de N.B.T. , procédant ensuite comme indiqué antérieurement. Comme on le remarque au tableau où sont exposés les résultats de l'étude de cette série de 20 adultes, le citrate de sodium n'a pas d'effet inhibiteur sur la réduction de N.B.T. par les granulocytes. Le sang de dix autres adultes a été utilisé pour le test de stimulation au latex.

3.1.2. Enfants de plus de 6 mois.

Cette série comprend 10 enfants âges de plus de 6 mois sans problème infectieux ni fièvre et 12 enfants âges de plus de 6 mois présentant des infections bactériennes prouvées. Les tests au N.B.T. ont toujours été exécutés sur des cellules prélevées à partir de sang citraté.

3.2. Population ayant fait l'objet de l'étude.

3.2.1. Nouveaux-nés à terme.

Cette série comprend 20 N.N. dont l'âge gestationnel variait entre 263 et 290 jours (38 à 41 semaines) et le poids, entre 2.870 et 4.300 gr. Tous ces enfants avaient un score d'Apgar de 8 et plus à 1 et 5 minutes; aucun n'a présenté de problème d'adaptation à la vie extra-utérine; aucun n'a présenté par la suite de signes cliniques ou hématologiques d'infection néonatale. Le prélèvement du sang a été fait dans le cordon ombilical à 0 heure de vie. Chez dix enfants de cette série, un

GROUPE A : PREMATURES NON INFECTES

No	Nom	A.G. sem.	Poids grs	Diag ostic	F.S.C. 4-168 h	Bactériologie	Antibiotiques 4-168 h	Cathétérisation art. ombilicale	Intubation + Vent.
1	C.A.	34 s.	2100	Watt- ung	N.D	Nég.	Non	Oui	Non
2	P.C.	32 s.	1640	S. apnéique	N.D	Nég.	Non	Oui	Non
3	M.C.	37 s.	1750	Incomp. Rh.	N.D	Nég.	Non	Oui	Non
4	G.V.	29 s.	1360	Pneumonose	N.D	Nég.	Non	Oui	Oui
5	K.L.	28 s.	1020	S. asphyxtique	N.D	Nég.	Non	Oui	Oui
6	P.I.	31 s.	1550	Prématurité	N.D	Nég.	Non	Oui	Non
7	A.L.	33 s.	1660	SDR fugace	N.D	Nég.	Non	Oui	Non
8	G.J.	34 s.	1840	Prématurité	N.D	Nég.	Non	Non	Non
9	M.V.	32 s.	240	Prématurité	N.D	Nég.	Non	Oui	Non
10	J.C.	35 s.	2140	SDR fugace	N.D	Nég.	Non	Non	Non
11	R. Cl.	34 s.	1920	Pneumonose	N.D	Nég.	Non	Oui	Oui
12	S.A.	32 s.	1730	Watt-long	N.D	Nég.	Non	Oui	Non
13	R.F.	34 s.	2310	Pneumonose	N.D	Nég.	Non	Oui	Oui
14	P.Fr.	31 s.	1800	Pneumonose	N.D	Nég.	Non	Oui	Oui
15	R.P.	30 s.	1280	Pneumonose	N.D	Nég.	Non	Oui	Non
16	P.S.	34 s.	2100	S. apnéique	N.D	Nég.	Non	Oui	Non
17	P.F.	34 s.	1720	S. apnéique	N.D	Nég.	Non	Oui	Non
18	D.A.	36 s.	2220	SDR fugace	N.D	Nég.	Non	Oui	Non

TABLEAU A : une F.S.C a été faite tous les jours (N.D = absence de déviation gauche). La bactériologie a toujours été négative (on a pratiqué entre 3 et 7 hémocultures chez chaque enfant). 2 enfants seulement (G.J. et J.C.) n'ont pas été cathétérisés et aucun ne reçut d'antibiotiques pendant les 168 premières heures de vie et 5 enfants sur 18 ont été ventilés artificiellement.

Tableau nº 1.-

test de stimulation au latex a été exécuté.

3.2.2. Nouveaux-nés prématurés.

Cette population comprend 30 N.N. prématurés. L'âge gestationnel variat entre 188 et 259 jours (27 à 37 semaines) avec des poids de naissance compris entre 740 gr. et 2.600 gr. Les prélèvements du sang sur citrate ont été, systématiquement, faits entre 4 et 24 heures, entre 25 et 48 heures, entre 49 et 72 heures, entre 73 et 120 heures et finalement, entre 121 et 168 heures.

3.2.2.1. Prématurés non infectés.

18 des 30 N.N. prématurés n'ont jamais présenté de problèmes infectieux (Tableau nº 1); aucun n'a reçu d'antibiotiques. Chez 16 d'entre eux, il a été posé une sonde à demeure dans une des artères ombilicales. Ces enfants ont été considérés comme indemnes d'infection et seront utilisés comme témoins normaux de la période néonatale précoce.

3.2.2.2. Prématurés infectés.

Les 12 autres N.N. prématurés ont présenté des signes

GROUPE B : PREMATURES INFECTES

No	Nom	A.G. sem.	Poids grs	Diagnostic	F.S. déviée 4-72 h, 73-168 h	Bactériologie	Antibiotiques 4-72 h, 73-168 h	Cathétérisation art. ombilicale	Int. Vent.
1	S.M.	33 s.	2060	Inf. prim.	•	Hémoc. •	•	Oui	Oui
2	T.L.	31 s.	1830	Inf. sec.	•	-	•	Oui	Oui
3	D.V.	29 s.	1180	Inf. sec.	•	Asp. trach. •	•	Oui	Oui
4	M.S.	34 s.	2350	Inf. prim.	•	-	•	Oui	Non
5	S.J.	36 s.	2400	Inf. sec.	•	Méc.-Urines •	•	Oui	Non
6	P.A.	31 s.	1980	Inf. sec.	•	Asp. trach. •	•	Oui	Oui
7	S. Mg	35 s	1770	Inf. sec.	•	Sonde art. •	•	Oui	Oui
8	S.A.	29 s.	1140	Inf. sec.	•	Asp. trach. •	•	Oui	Oui
9	S.T.	36 s.	2600	Inf. prim.	•	-	•	Oui	Oui
10	A.M.	30 s.	1280	Inf. sec.	•	Hémoc. •	•	Oui	Non
11	V.S.	34 s.	1820	Inf. prim.	•	-	•	Oui	Non
12	J.Fr.	27 s.	920	Inf. sec.	•	Hémoc. •	•	Oui	Oui

TABLEAU B : le F.S. montrait dans tous les cas une déviation gauche; la bactériologie a été positive dans 8 enfants sur 12. Tous les enfants ont été cathétérisés et mis sous traitement d'antibiotiques. 8 enfants sur 12 ont été ventilés artificiellement.

Tableau nº 2.-

cliniques et paracliniques compatibles avec le diagnostic d'infection néonatale soit primaire, soit secondaire. Tous ont été mis sous antibiotiques. Les 12 etaient porteurs d'une sonde artérielle ombilicale (Tableau nº 2).

Les critères d'infection ont été les suivants :

1. Entre 0 et 72 heures (Infection primaire).

- La F.S.C. présente un plus grand nombre des P.N. jeunes (du myélocyte au bâtonnet) que de neutrophiles segmentés.

- Présence de granulations grossières
- Thrombocytes à moins de 100.000/mm^3.

2. A partir de 73ème heure de vie (Infection secondaire), le diagnostic d'infection est évoqué en présence de 8 % et plus de formes jeunes dans la formule d'Arneth.

La série renferme 4 infections primaires et 8 infections secondaires. Les examens bactériologiques se répartissent comme suit : 3 hémocultures positives, 3 aspirations trachéales positives, 1 culture positive sur le cathéter artériel et l'autre enfant avec E. Coli dans les urines. Chez les 4 derniers enfants, la bactériologie est restée négative mais tous les 4 avaient des F.S.C. compatibles avec le diagnostic d'infection.

TABLEAU SYNOPTIQUE DES RESULTATS

(Valeurs Exprimées en ‰)

	Adultes	< 6 mois		N.N. a terme	N.N. Prématurés										
					Non Infectées					Infectées					
		Sans Infect	Avec Infect		4-24h	25-48h	49-72h	73-120h	121-168h	4-24h	25-48h	49-72h	73-120h	121-168h
N	20 cas	10 cas	12 cas	20 cas	18	18	18	18	18	12	12	12	12	12
$\bar{m}$	3.44	2.85	28.37	8.37	10.55	18.10	21.11	24.42	10.71	7.16	17.50	26.90	25.4	10.44
σ	1.01	0.74	4.61	3.43	2.98	2.26	2.87	6.57	2.21	1.38	3.12	3.57	3.67	2.23
Range	1.6 - 6.2	1.6 - 3.8	17.0 - 74.0	4 - 15	5-30	3-30	4-43	6-58	5-17	5-16	6-33	8-47	3-21	5-28

Tableau nº 3.-

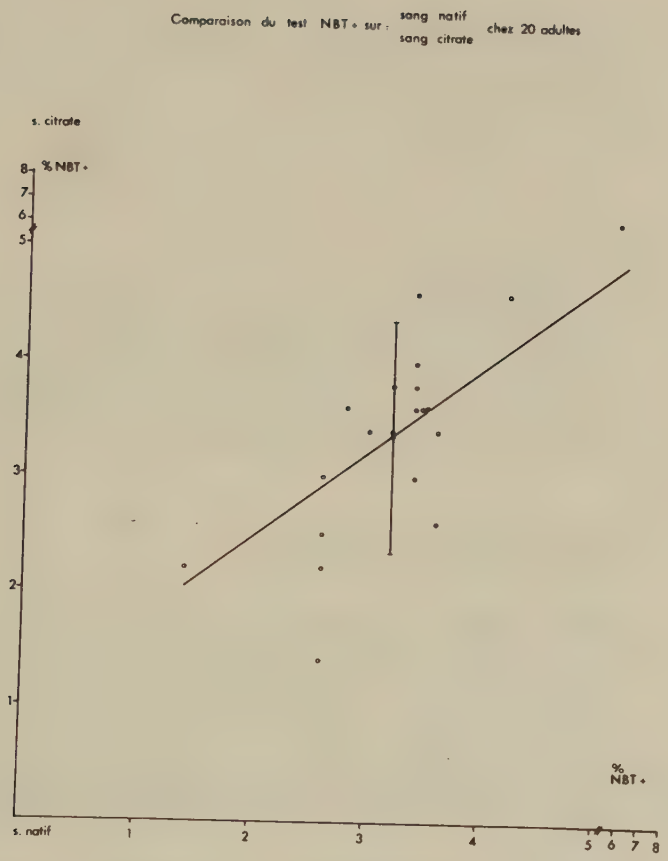
Comparaison du test NBT + sur : sang natif / sang citrate chez 20 adultes
s. citrate
% NBT +
8
7
6
5
4
3
2
1
% NBT +
s. natif
1
2
3
4
5
6
7
8

Figure nº 1.-

4. Statistique et expression des résultats.

Tous les résultats sont exprimés par la moyenne (X) des valeurs trouvées plus ou moins une déviation standard (S.D.). La comparaison de valeurs trouvées dans les différentes populations a été faite au moyen du test de Student (33), pour petit nombre.

III. RESULTATS.

Le tableau nº 3 est un tableau synoptique qui montre l'ensemble de résultats avec le nombre d'expériences, la moyenne, l'écart type et les valeurs extrêmes de la dispersion (range) pour chaque population étudiée.

1. Les adultes. Figure nº 1.

Dans la série de 20 adultes sains, le test au N.B.T. sur du sang citraté montre une valeur moyenne des granulocytes N.B.T. positifs de 3,44 % (S.D. $\pm$ 1,01). Ces valeurs sont inférieures à celles de 8 % (range 3-11) indiquées par PARK (26) mais sont identiques aux résultats trouvés par d'autres auteurs (6, 11, 18, 22, 36).

Egalement, dans la Figure nº 1, on montre comment le citrate de sodium ne modifie pas la capacité réductrice du N.B.T. des granulocytes. En effet, les résultats du test sont identiques, aussi bien en utilisant du sang citraté que du sang natif.

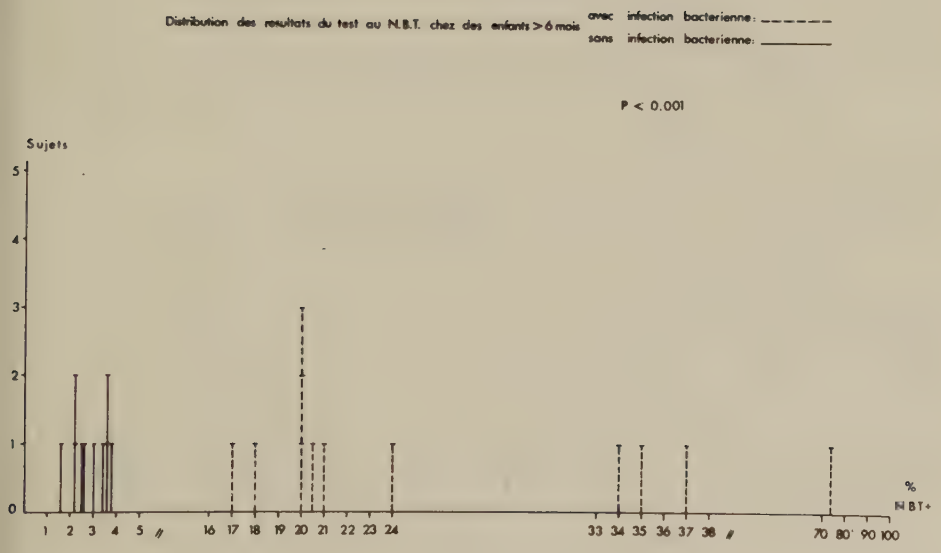
Distribution des resultats du test au N.B.T. chez des enfants > 6 mois
avec infection bacterienne: _ _ _ _ _ _
sans infection bacterienne: _____
P < 0.001
Sujets
5
4
3
2
1
0
1 2 3 4 5 // 16 17 18 19 20 21 22 23 24 33 34 35 36 37 38 // 70 80 90 100
%
N B T+

Figure nº 2,-

2. Les enfants âgés de plus de 6 mois avec et sans infection bactérienne. Figure nº 2.

Chez les enfants sans infection bactérienne et âgés de plus de 6 mois, le pourcentage de granulocytes N.B.T. positifs est de 2,85 % (S.D.± 0,74) et le range de 1,6 à 3,8.

Chez les 12 autres enfants âgés de plus de 6 mois et ayant une infection bactérienne prouvée, le pourcentage de granulocytes N.B.T. positifs est de 28,37 % (S.D.± 4,61) avec des limites extrêmes de 17 % et 74 %. Ces résultats sont absolument comparables à ceux trouvés dans la littérature (10, 17, 22, 26, 27, 36). Ces résultats concordent avec le fait démontré par PARK et coll., que les granulocytes au moment de la phagocytose accélèrent leur métabolisme : la consommation d'oxygène augmente, stimule le shunt des hexoses-monophosphate et on assiste également à une élévation de l'oxydation de la forme réduite de NADPH et de la production de péroxyde d'hydrogène.

Ce péroxyde d'hydrogène serait, d'après DOSSET, le principal agent bactéricide des neutrophiles et il est produit par médiation de NADPH oxydase transformant le NADPH en NADP (12, 16, 21). Cet ion H est utilisé pour la formation de peroxyde d'hydrogène ou bien il est pris par une diaphorase qui le passe au N.B.T. qui, à ce moment-là, change de coloration, devenant formazan hydro-insoluble. Dans cette série d'enfants infectés, les bactéries in vivo déclanchent toute la cascade métabolique déjà décrite, à l'interieur des granulocytes, de sorte que, quand ils sont étudiés in vivo avec le test au N.B.T. ils présentent un pourcentage de réduction très élevé.

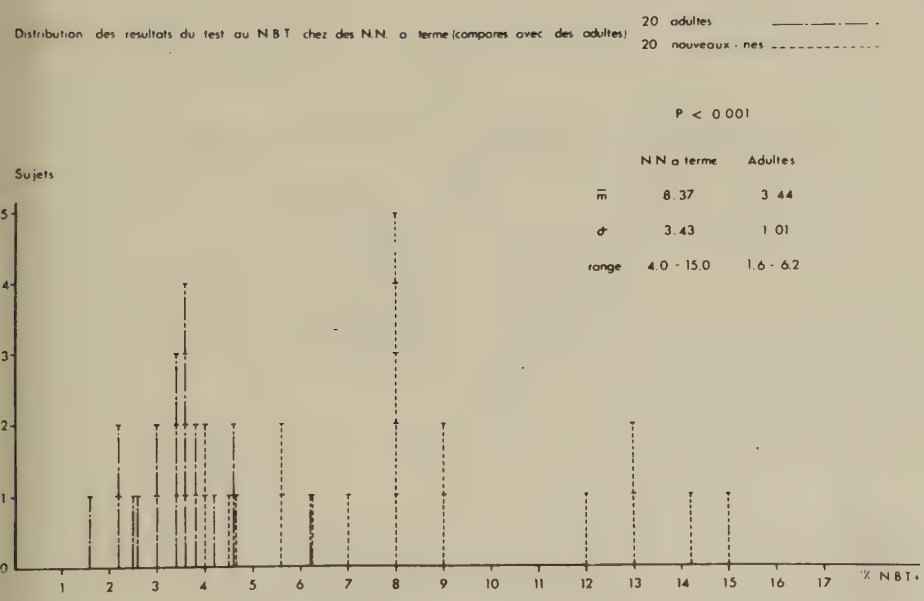
Distribution des resultats du test au N.B.T chez des N.N. a terme (compares avec des adultes)
20 adultes
20 nouveaux - nes
P < 0.001
N.N a terme
Adultes
m̄ 8.37 3.44
σ 3.43 1.01
range 4.0 - 15.0 1.6 - 6.2
Sujets
% N.B.T.

Figure nº 3.-

Distribution des resultats du test au NBT chez des N.N. prematurés non infectés (4-24 h.) comparé avec des adultes — 20 adultes, 18 prématurés.

$P > 0.05$ $P < 0.01$

	N.N. à terme	Prematurés	Adultes
$\bar{m}$	8.37	10.55	3.44
σ	3.43	2.98	1.01
Range	4.0 - 15.0	1.5 - 38.0	1.8 - 6.2

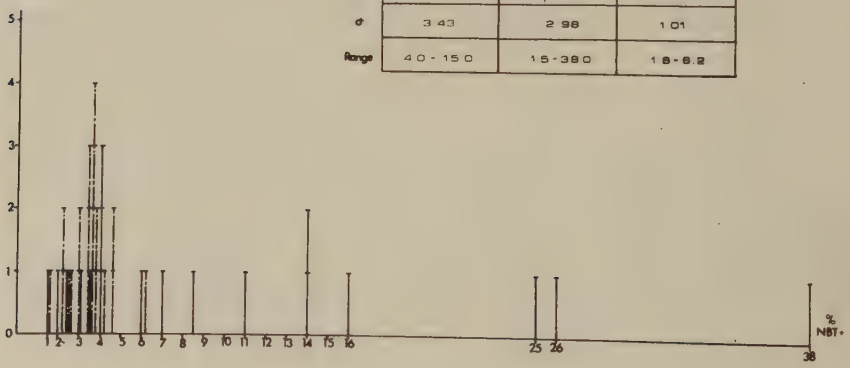

Figure nº 4.-

3. Conclusions.

Les études entreprises sur les deux séries témoins ont montré des résultats comparables à ceux de la littérature. Il en est déduit que les conditions expérimentales sont semblables à celles d'autres groupes de travail.

4. Les nouveaux-nés. Figure nº 3.

Chez les 20 N.N. à terme étudiés à 0 heure de vie (sang du cordon), la moyenne des granulocytes N.B.T. positifs est de 8,37 % (S.D. ± 3,43) avec des extrêmes de 4 à 15 %. Ces chiffres sont significativiment plus élevés que chez l'adulte ($p < 0.001$)
Cependant, PARK et coll. obtiennent une moyenne de 38,5 %, HUMBERT 35 % et COCHI 30 %, chiffres plus élevés que les nôtres. D'autre part, JEMELLIN et coll. trouvent une moyenne de 1,15 % de granulocytes N.B.T. positifs chez le nouveau-né, chiffre inférieur à celui trouvé dans ce travail.

5. Les N.N. prématurés. Figure nº 4.

Chez les N.N. prématurés non infectés, le test au N.B.T. exécuté entre 4 et 24 heures de vie, montre une moyenne des granulocytes N.B.T. positifs de 10,53 % (S.D.±2,98). Ce résultat n'est pas significativement différent de celui du sang du cordon chez les N.N. à terme mais est significativement plus élevé que chez l'adulte ($p < 0,01$)

5.1. N.N. prématurés non infectés. Figure nº 5.

Plus intéressante est l'évolution du nombre de granulocytes N.B.T. positifs au cours de la première semaine de vie. Les deux catégories de N.N. prématurés non infectés et infectés sont étudiées séparément. Ainsi, de 10,55 (S.D.± 2,98) entre 4 et 24 heures la moyenne de granulocytes N.B.T. positifs passe à 18,10% (S.D.± 2,96) entre 25 et 48 heures à 21,10 %(S.D.±2,87) entre 49 et 72 heures, plafonnant entre 73 et 120 heures à 24,42 % (S.D.± 6,97) et redescendant entre 121 et 168 heures à 10,71 % (S.D.± 2,91). Aucune comparaison ne peut être faite avec d'autres auteurs, aucun d'entre eux n'observant l'âge de l'enfant avec rigueur.

5.2. Nouveaux-nés prématurés infectés. Figure nº 5.

L'évolution des résultats du test au N.B.T. chez les 12 prématurés supposés infectés est superposable à l'évolution ches les N.N. prématurés non infectés. Entre 4 et 24 heures, le nombre de granulocytes N.B.T. positifs est de 7,16 % (S.D.± ..,38), entre 25 et 48 heures, de 17,50 % (S.D.± 3,12), entre 49 et 72 heures de 26,90 % (S.D.± 3,57), entre 73 et 120 heures, de 25,4 % (S.D.± 3,67) et entre 121 et 168 heures, de 10,44 % (S.D.± 2.25).
Dans les deux séries, la montée la plus importante s'opère entre la 25ème et la 48ème heure de vie. L'évolution du pourcentage des granulocytes N.B.T. positifs ne diffère pas significativement chez les prématurés infectés des non infectés. Cette évolution exclut l'emploi du test au N.B.T. pour confirmer ou infirmer le

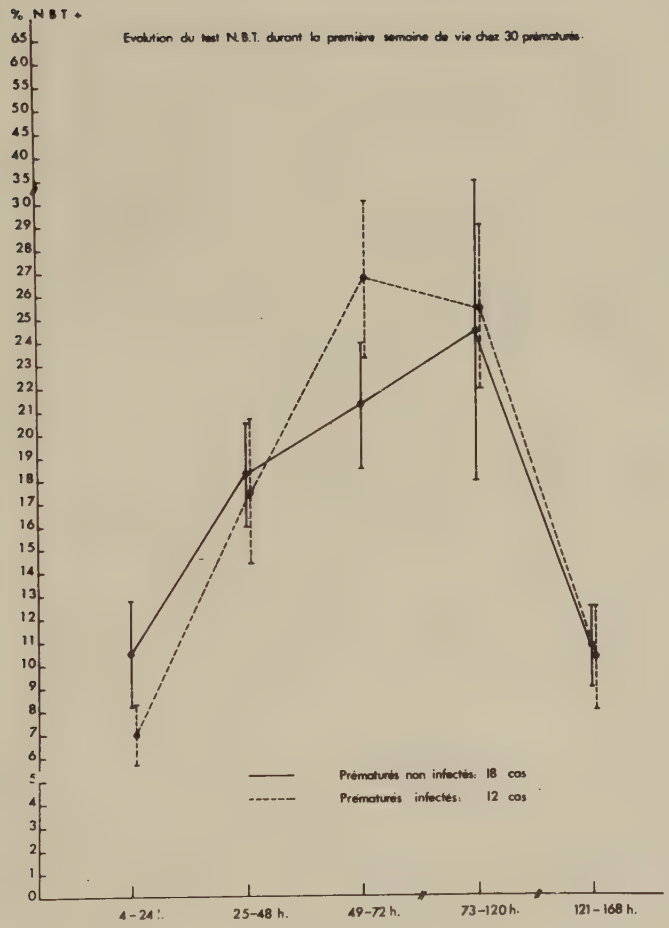
% N B T +
Evolution du test N.B.T. durant la première semaine de vie chez 30 prématurés.
65
60
55
50
45
40
35
30
29
28
27
26
25
24
23
22
21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Prématurés non infectés: 18 cas
Prématurés infectés: 12 cas
4 - 24 h.
25-48 h.
49-72 h.
73-120 h.
121 - 168 h.

Figure nº 5.-

diagnostic d'infection pendant la période néonatale précoce.
La chute des granulocytes N.B.T. positifs qui a lieu entre le 5ème et le 7ème jour de vie dans les deux séries est très importante. Chez les prématurés non infectés, le chiffre de 24,42 % descend jusqu'à 10,71 % avec un $p < 0,05$ et chez les prématurés infectés, il descend de 25,40 % jusqu'à 10,44 % avec un $p < 0,05$. Cette chute de la courbe ne peut pas s'expliquer par un effet des antibiotiques (15) parce que les enfants de la première série n'en ont jamais reçu.

5.3. Relation entre test au N.B.T., conditions cliniques et examens paracliniques.

Aucune relation n'a été trouvée entre le nombre des leucocytes totaux, le nombre de formes jeunes (promyélocytes, myélocytes jeunes, myélocytes mûrs, métamyélocytes, neutrophiles non segmentés), le nombre des neutrophiles segmentés et le taux de granulocytes N.B.T. positifs. Il n'a pas pu être prouvé que la réduction du N.B.T. est plus active dans les neutrophiles segmentés que dans les formes jeunes.
En outre, le pourcentage des granulocytes N.B.T. positifs ne dépend ni de l'âge gestationnel ni du poids de naissance.
Des conditions périnatales particulières n'ont aucun effet sur le nombre de granulocytes N.B.T. positifs; les valeurs élevées rencontrées à cet âge n'ont pas pu être expliquées dans notre série, ni par la présence d'une funiculite (10/30 enfants) ni par la rupture prématurée de la poche des eaux (7/30), ni par les manoeuvres obstétricales : césarienne (5/30), forcepts

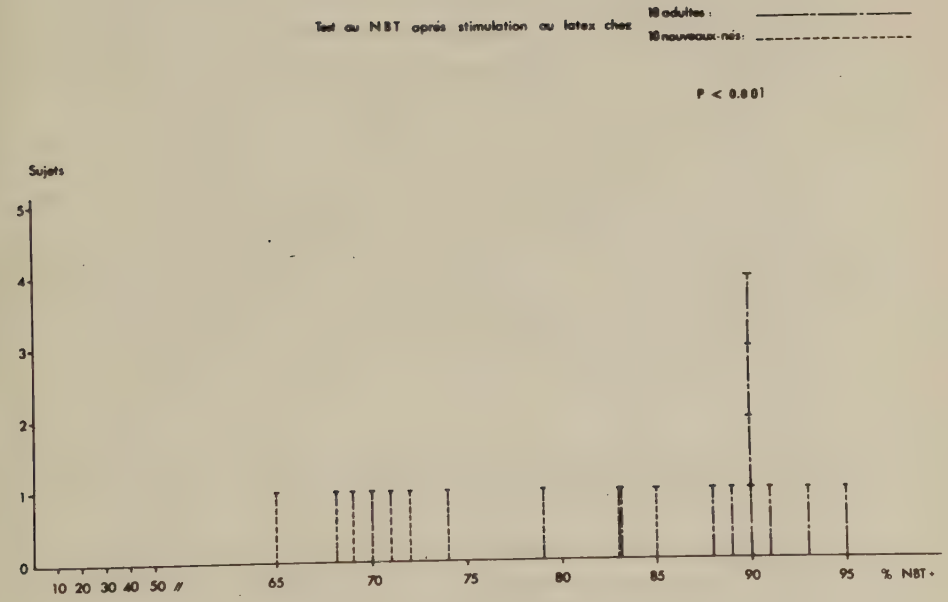
Test au NBT après stimulation au latex chez
18 adultes :
18 nouveaux-nés :
P < 0.001
Sujets
5
4
3
2
1
0
10 20 30 40 50 //
65
70
75
80
85
90
95
% NBT+

Figure nº 6.-

(4/30) et présentation du siège (1/30).
De même, il ne semble pas que le fait de mettre les enfants en respiration assistée n'influence la réduction du N.B.T. par les P.N. Treize enfants ont eu besoin d'une ventilation artificielle, et le pourcentage des granulocytes N.B.T. positifs n'est pas significativement différent de celui des non-ventilés.
Par contre, le rôle de la cathétérisation de l'artère ombilicale n'a pu être étudié d'une façon systématique, en effet, seuls 2 enfants n'ont pas été cathétérisés. Cependant, l'évolution du nombre de granulocytes N.B.T. positifs de ces deux cas n'est pas significativement différente des autres, porteurs d'une sonde à demeure.
Ce travail ne donne aucun renseignement concernant l'âge auquel les N.N. prématurés ou non atteignent des pourcentages de réduction du N.B.T. semblables à ceux de l'adulte. D'après PARK (27), cela se passerait à partir du 7ème jour de vie. Dans les 2 séries de prématurés étudiées dans ce travail, le taux de N.B.T. reste encore élevé à l'âge de 7 jours par rapport à l'adulte ($p < 0.001$)

6. Test au N.B.T. après stimulation au latex. Figure nº6.

Chez l'adulte, la valeur moyenne des granulocytes ayant pris le latex et réduit le N.B.T. est de 90,18 % (S.D.$\pm$ 3,13) avec des extrêmes de 83 % à 95 % et chez les N.N. de 73,83 % (S.D.$\pm$ 6,73) avec des extrêmes de 65 % à 85%
Cette différence du pouvoir maximal de réduction du N.B.T. entre l'adulte et le N.N. lorsque leurs granulocytes sont stimulés in vitro par le latex est très significative ($p < 0.001$). Ce comportement est très frappant; en effet,

" au repos ", le nombre de granulocytes N.B.T. positifs est plus élevé que le N.N. à terme par rapport à l'adulte, alors que la stimulation maximale reste inférieure chez le N.N. en comparaison avec l'adulte.

IV. DISCUSSION.

Les résultats qui méritent une discussion sont : les hautes valeurs du test du N.B.T. pendant la période néo-natale, l'évolution ascendante du nombre de granulocytes N.B.T. positifs pendant les premiers jours de la vie, la réaction paradoxale du granulocyte du nouveau-né quand on le stimule avec le latex.

1.- Les résultats trouvés chez les N.N. avec le test au N.B.T. sont en principe en accord avec les valeurs trouvées par d'autres équipes dans le sens qu'ils sont significativement élevés par rapport à l'adulte ($p < 0.001$), Figure nº 3. Seuls JEMELIN et coll. trouvent des valeurs plus basses chez les N.N. que chez l'adulte (18). Cependant, on n'a pas pu rencontrer chez les nouveaux-nés sains, dont le sang avait été prélevé du cordon, le même pourcentage de N.B.T. réduit que PARK dans sa série de 20 N.N. à terme (27). Une des raisons qui pourrait expliquer la différence signalée est que PARK travaille avec l'héparine. En effet, il ajoute 100 U.I. d'héparine par c.c. de sang, ce qui, d'après MIESCHER favorise la phagocytose (35). On a étudié dans une série de dix adultes le test au N.B.T. sur du sang natif et sur du sang hépariné. Sur du sang natif, la moyenne de granulocytes N.B.T. positifs est de 3,25 % (S.D.$\pm$ 0,83) et sur du sang hépariné 4,04 (S.D.$\pm$ 0,92).

Cependant, on n'a pas étudié ici si cet effet stimulateur de l'héparine est plus grand sur les granulocytes du nouveau-né, ce qui expliquerait que les chiffres trouvés pas PARK et coll. sont plus élevés que ceux obtenus dans ce travail. Dans la Figure nº 1. on voit comment le citrate de sodium n'est pas responsable de la différence des valeurs trouvées. D'autre part, il se pourrait qu'en travaillant avec la couche leucocytaire comme il a été fait, les neutrophiles subissent des modifications, notamment aprés la centrifugation (3,19), aboutissant à un plus petit pouvoir réducteur du N.B.T. Mais encore ici, il faut insister sur le fait que ce serait un effet particulier de la centrifugation sur les granulocytes des nouveaux-nés puisque chez les adultes et chez les grands enfants, on a obtenu les mêmes valeurs que PARK et coll., travaillant toujours avec la même technique et toujours sans héparine. HUMBERT trouve dans une série de 19 cas 16 nouveaux-nés et 3 prématurés, travaillant sur du sang hépariné, une moyenne des granulocytes N.B.T. positifs de 35 %. Ce chiffre est aussi plus élevé que le nôtre mais il est superposable à celui que nous avons obtenu dans notre série de prématurés. La comparaison entre les chiffres trouvés par cet auteur et les nôtres est difficile parce que HUMBERT étudie dans un seul lot nouveaux-nés et prématurés(17). D'autre part, il ajoute du glucose au milieu, créant ainsi des conditions de travail fort différentes des nôtres et surtout de la situation in vivo. En effet, en ajoutant du glucose, on augmente le substrat métabolique des granulocytes en leur fournissant de l'énergie supplémentaire qui produirait une augmentation de la réduction du N.B.T. (4).

COCHI et coll. ont trouvé chez 10 N.N. une moyenne de 36,1% (S.D.$\pm$ 13,5) des granulocytes N.B.T. positifs et dans une série de prématurés non infectés, le chiffre est de 25,8 %

(S.D.± 24, 1).

A la différnece de HUMBERT, COCHI étudie séparément nouveaux-nés et prématurés. En ce qui concerne les premiers, ses valeurs sont aussi plus élevées que celles qui sont rapportées dans ce travail, mais celles qui concernent les prématurés sont identiques. Cependant, la comparaison des résultats obtenus par cette équipe doit être très prudente, parce que les tests de N.B.T. furent faits à des intervalles de temps très grands et non définis, de la 3ème heure jusqu'au 30ème jour de vie (5,6). Etant donné la vitesse avec laquelle les paramètres biologiques varient pendant les premiers jours de vie, il semble judicieux, pour toute comparaison, de s'en tenir à des âges bien précis. Cette même équipe (5) affirme, après avoir étudié une série de 5 prématurés infectés avec le test au N.B.T. à des intervalles de temps de 6 jours, que l'infection bactérienne est responsable d'une chute du nombre de granulocytes N.B.T. positifs. Ceci, en effet, est en contraduction avec les faits rapportés dans ce travail où on a constaté qu'une chute dans le nombre de granulocytes N.B.T. positifs se passe à partir de la 121ème heure de vie aussi bien chez les prématurés infectés que chez les non infectés. JEMELIN et coll. trouvent dans une série de nouveaux-nés un pourcentage de granulocytes N.B.T. positifs de 1,13 (S.D.± 0.11). CES AUTEURS, DANS LE MEME TRAVAIL (18) TROUVENT DANS LES LEUCOCYTES DE CES NOUVEAUX-NES DES VALEURS DE PHOSPHOGLYCEROKINASES ET DES P.K. ABAISSEES RESPONSABLES, SELON EUX, DE L'ABAISSEMENT DU POUVOIR REDUCTEUR DU N.B.T.. CE TRAVAIL EST CEPENDANT LE SEUL QUI TROUVE UNE DIMINUTION DU POUVOIR REDUCTEUR CHEZ LES LEUCOCYTES DE N.N.

Un des motifs qui expliqueraient les basses valeurs trouvées par JEMELIN et coll. est que leur technique comporte un intervalle de temps plus grand entre la prise de sang et la réalisation du test car ils travaillent avec le caillot. Il est possible que pendant ce laps de temps, les granulocytes perdent leur équipement énergétique et réduisent à une moindre quantité le N.B.T.

2.- Un autre fait qu'il faut souligner dans ce travail est l'évolution du pourcentage de granulocytes N.B.T. positifs pendant les sept premiers jours de la vie. En effet, ce nombre déjà haut dans les premières 24 heures de vie, augmente progressivement jusqu'aux 121 heures, moment auquel se produit une baisse. Cette progression ascendante du nombre de granulocytes N.B.T. positifs aux 24, 48, 72 et 121 heures de vie avec la baisse ultérieure aux 168 heures, est très spectaculaire. (Figure nº 5). En outre, aux 168 heures de vie, malgré la chute, le test du N.B.T. reste élevé si on le compare à l'adulte.

KARNOVSKI a prouvé que la glycolyse aérobie est la source la plus importante d'énergie des P.N. surtout en relation avec la phagocytose (20,32). Etant donné que la quantité de P.K. et A.K. est grande à l'intérieur des leucocytes des N.N. et des prématurés (38), on peut ainsi admettre que la glycolyse soit augmentée dans la période néonatale, et que ceci s'accompagne d'une plus grande activité des granulocytes, qui réduisent davantage le N.B.T. pendant les 5 permiers jours de vie.

PARK et coll. (28) dans une étude récente, ont démontré que les granulocytes des N.N. en état de repos possèdent un métabolisme intraleucocytaire augmenté. Ils ont constaté

que les leucocytes de ces enfants consomment plus d'oxygène et de glucose, ils produisent plus de CO_2 et de lactate et ils ont une plus grande captation d'inuline 1^4 - C. Tous ces faits avec ceux rapportés par KARNOVSKI (20), SBARRA (32) et YOSHIDA (38) expliqueraient en partie la plus grande réduction du N.B.T. pendant la période néonatale. En effet, les données biochimiques rapportées par ces auteurs expliquent bien la deuxième étape du test au N.B.T: c'est-à-dire la réduction du N.B.T. même à l'intérieur du granulocyte. Cependant, la première étape qui consiste dans le passage du N.B.T. au travers de la membrane cellulaire reste inexpliquée. Pour cela, toute interprétation du test du N.B.T. ainsi que de ses résultats doit tenir compte de ces deux phases: premièrement, le passage du N.B.T. à l'intérieur du leucocyte - ce qui suppose un degré de perméabilité cellulaire déterminé - et deuxièmement, le processus de réduction du colorant par les enzymes leucocytaires. Pour cela, le nombre de granulocytes N.B.T. positifs de plus en plus grand jusqu'aux 121 heures de vie, moment où il descend progressivement jusqu'aux 168 heures (Figure nº 5), doit se justifier par des causes qui agissent conjointement sur les deux phases mentionnées du processus. En effet, les N.N. et les prématurés au moment de la naissance sortent d'un milieu "germ-free" pour passer dans un milieu contaminé par une flore bactérienne variée. Ces germes saprophytes ou non, qui pénètrent dans les N.N. arrivent à endommager la membrane leucocytaire, la perméabilisant davantage au N.B.T. qui, une fois à l'intérieur des neutrophiles, est réduit à plus fortes doses, en raison de son métabolisme augmenté. Cete hypothèse concorde avec le fait trouvé dans ce travail, que les test de N.B.T. les plus élevés furent

ceux des enfants qui eurent des hémocultures positives. Il se pourrait aussi que lesgermes n'aient pas directement cet effet sur la membrane et que ce soit leurs produits de dégradation. Cet effet perméabisateur du granulocyte pourrait être celui de substances encore non identifiées - d'origine maternelle ou placentaire- qui motiveraient un plus grand passage de N.B.T. à l'intérieur des granulocytes pendant les premiers jours de la vie. Cela concorde avec ce qui a été démontré par PARK, que les granulocytes du nouveau-né possédent un grand pouvoir de captation d'inuline 14-C (28).
Il est évident que l'effet de ces germes et de ces substances sur les granulocytes - tant sur leur membrane que sur leur métabolisme- doit être passager, comme on peut voir sur la courbe d'évolution du test du N.B.T. pendant la première semaine de la vie (Figure nº5). Sur cette courbe, on voit comment l'action sur la perméabilité cellulaire et le métabolisme leucocytaire est importante jusqu'au 5ème jour, moment où elle diminue pour finir par disparaître.
Cette hypothése de travail reste à etre prouvée.

3.- Le troisième fait à mentionner est le résultat obtenu avec le test de stimulation au latex. En effet, le fait d'avoir trouvé que le nouveau-né a des valeurs de 73,83 % (S.D.$\pm$ 6,73) et l'adulte, de 90,18 % (S.D.$\pm$ 3,13), et que ces valeurs soient significativement inférieures ($p < 0,001$)serait en accord avec la thèse de JEMELIN et coll. (18), selon laquelle l'équipement enzymatique du granulocyte du nouveau-né est inférieur à celui de l'adulte. Mais cela pourrait aussi s'expliquer par un phénomène d'épuisement de la charge enzymatique du granulocyte du nouveau-né. Cette charge dans le

granulocyte au repos est grande, comme l'ont démontré PARK (28), SBARRA (32) YOSHIDA (38) et KARNOVSKI (20) en opposition aux découvertes de JEMELIN (18). Cette dernière thèse expliquerait en outre tous les faits trouvés dans ce travail : que le granulocyte du nouveau-né réduit, au repos et dans des conditions normales, plus de quantité de N.B.T. que l'adulte (Figure nº 3), que le nombre de granulocytes N.B.T. positifs augmente progressivement du fait qu'il existe une stimulation non spécifique jusqu'au 5ème jour de vie, moment où le nombre décroît jusqu'aux 168 heures de vie, du fait que s'est épuisée la capacité de réponse, fait qui concorde, enfin, avec le résultat obtenu avec le test de stimulation avec latex.

4.- Pour terminer, il faut insister sur le fait que le nombre de granulocytes N.B.T. positifs est semblable dans la série de prématurés infectés et dans celle des non infectés (Figure nº 5). Il en résulte que le test de N.B.T. ne peut, être utilisé pour établir le diagnostic d'infection pendant la période néonatale précoce, Il n'a pas été possible de trouvér une évolution particulieré du nombre de granulocytes N.B.T. positifs chez les prématurés qui présentèrent une infection en analogie avec COCHI et coll. que dans une série de 5 prématurés avec infection bactérienne, trouvèrent que le test du N.B.T. était anormalement bas (5). Ils obtinrent ce résultat en pratiquant le test du N.B.T. à intervalles de 6 jours de sorte qu'il pourrait se faire que les basses valeurs trouvées dans ces 5 enfants correspondent à la chute trouvée par nous, tant chez les prématurés normaux que chez les infectés aprés 168 heures de vie. Aucune

autre comparaison ne peut être faite car aucune autre équipe n'a étudié systématiquement le test du N.B.T. dans l'infection néonatale à intervalles fixes et réduits.

R E S U M E.-

1. La réduction du nitrobleu de tetrazolium par les granulocytes des nouveaux-nés à terme et des prématurés a été étudiée avec une technique modifiée de PARK et coll. Cette étude porte sur 30 adultes sains, 22 enfants de plus de 6 mois (dont 12 avec infection bactérienne), sur 20 nouveaux-nés à terme (sang du cordon) et sur 30 prématurés (dont 12 présentaient une infection bactérienne vraisemblable).

2. Chez les N.N. à terme à 0 heure de vie (sang du cordon), le pourcentage de granulocytes N.B.T. positifs est de 8,33 % (S.D.$\pm$ 3,43) et chez les nouveaux-nés prématurés à l'âge de 4-24 heures de vie, de 10,55 % (S.D.$\pm$ 2,98). Pour les deux populations, les valeurs trouvées sont significativement plus élevées que chez l'adulte $p < 0,01$.

3. Chez les N.N. prématurés, le test du N.B.T. a été fait systématiquement entre 4 et 24 heures, 25 et 48, 49 et 72, 73 et 120 heures et entre 121 et 168 heures de vie. Il a été démontré que les nombres des granulocytes N.B.T. positifs, déjà élevés au premier jour de la vie, montent continuellement jusqu'à une valeur maximale que l'on trouve entre le 3ème et le 5ème jour de la vie. A partir du 5ème jour, le nombre de granulocytes N.B.T. positifs descend brusquement jusqu'au 7ème jour.

4. Le test au N.B.T. après stimulation au latex montre

un pouvoir maximal de réduction du N.B.T. chez l'adulte de 90,18 % (S.D.± 3,13) et chez les N.N. à terme, de 73,83 % (S.D.± 6,73). Cette différence est statistiquement significative ($p < 0.001$)

5. Une étude comparative entre N.N. prématurés infectés et non infectés montre que le test au N.B.T. ne peut pas être utilisé pour le diagnostic des infections bactérienne pendant la période néonatale, ceci, contrairement à ce qui se passe au-delà de l'âge de 6 mois, où ce test s'avère très utile.

B I B L I O G R A P H I E .

1. BAEHNER. R.L. and NATHAN, D. Quantitavive nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease, New England J. Medecine 278, 971.1968.

2. BAEHNER R.L. Disorders of leucocytes leading to recurrent Infection. Ped. Clin. of N. America, 19, 935. 1972.

3. BRANDT. L. Studies on the phagocytic activity of neutrophilic leucocytes. Scand. J. Hemat. Supl. II. 1967.

4. BROGAN. T.D. Mechanism of Phagocytosis in human Polymorphonuclear Leucocytes. Immunology 10. 137. 1966.

5. COCHI. P. MORI, S., BECATTINI. A. N.B.T. tests in premature infants. Lancet II, 1.426 . 1969.

6. COCHI. P., MORI, S., BECATTINI, A. Nitroblue Tetrazolium reduction by neutrophils of newborn infants in vitro phagocytosis test. Acta Paediat. Scand. 60, 467. 1969.

7. DEJESUS. M. FIKRIG. S., DETWILER, Th. Phagocytosis stimulated nitroblue tetrazolium reduction by platelets.
J.Lab. Clin. Med. 80.117 - 1.97.

8. DOSSET. J. Microbial defenses of the child and man. Ped. Clin. Of N. America 19, 355 - 1972.

9. DOSSET. J. WILLIAMS. R. and QUIE. P. Studies on interaction of bacteria serum factors and polymorphonuclear leucocytes in mothers and newborns. Pediatrics, 44. 49. 1969.

10. FEIGIN. R. , SHACKELFORD. P., SUNG C.C., FLAKE K. et al. Nitroblue tetrazolium test as an aid in the differential diagnosis of febrile disorders. J. Pediatr. 78, 230. 1971.

11. FREEMAN. R., KING. B. Infective complications of indwelling intravenous catheters and the monitoring of infections by the nitroblue tetrazolium test. Lancet I, 992 . 1972.

12. GIFFORD. R. , MALAWISIA.S. A simple rapid micromethod for detecting chronic granulomatous disease of childhood.
J. Lab. Clin. Med. 75, 511. 1970.

13. HENKEL. J., CARAGUSI. V. Corticosteroid effect on phagocytosis and N.B.T. reduction by human polymorphonuclear neutrophils. J. Reticuloendothel. Society 11, 358. 1972.

14. HITZIG. W., MOLZ. G., PLUS. H. Progressive septische granulomatose. Helv. Paediat. Acta 24, 246. 1969.

15. HOEPRICH. P., MARTIN. C. Effect of tetracycline, polymixin B. and rifampin on phagocytosis. Clin. Pharm. Therap. 11. 418. 1972.

16. HOLMES. B., QUIE. P., WINDHORST. D. GOOD. R. Fatal granulomatous disease of childhood. Lancet I 1.225. 1966

17. HUMBERT.J., KURTZ. M., HATHAWAY. W. Increased reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophils of newborn infants.
Experience and Reason, 45. 125 - 1970.

18. JEMELIN.M. FORNEROD. M., FREI.J., PROD'HOM L.S. Impaired phagocytosis in leucocytes from newborn infants. Enzyme 12, 642. 1971.

19. JOHNSTON. R., KLEMPERER. M., ALPER. C., ROSEN. F. The enhancement of bacterial phagocytosis by serum. The J. of Exp. Medec. 129.1.225. 1969.

20. KARNOVSKI. M.L. Metabolic basis of phagocytic activity.
Ann. Physiol. Rev. 42.143. 1962.

21. MANDELL. G., RUBIN. W., HOOK. E. The effect of an NADH oxidase inhibitor (hydrocortisone) on polymorphonuclear leucocyte bactericidal activity. J. Clin. Invest. 49- 1.381 - 1970.

22. MATULA. G., PATERSON. Ph. Spontaneous in vitro reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophils of adult patients with bacterial infection. New Engl. J. Med. 285, 311. 1971.

23. MITLLER. M. Phagocytosis in the newborn infant : Humoral and cellular factors. J. Pediatr. 74, 255. 1969.

24. NEWSOME. J. Phagocytosis by human neutrophils. Nature 214, 1.092 - 1967.

25. NICOLA. P., DAVERID.P., GABUTTI. V. Il test del nitroblu di tetrazolio nel neonato. Min. Ped. 27. 1.388 - 1971.

26. PARK. B., FIKRIG.S., SMITHWICK. E. Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. Lancet II. 532. 1968.

27. PARK. B. The use and limitations of the nitroblue tetrazolium test as a diagnostic aid. J. Pediat. 78. 376 - 1971.

28. PARK.B., HOLMES.B., GOOD. R. Metabolic activities in leucocytes of newborn infants. J. Pediat. 76, 237 - 1970.

29. PARK. B., HOLMES.B., RODEY. G., GOOD.R. Nitroblue tetrazolium test in children with fatal granulomatous disease and newborn infants. Lancet I, 157- 1969.

30. PAUPE. J., MEYER.B. Moyens de défense contre l'infection XXI Congrès de l'Assoc. des Pédiatres de langue française. T. III. 153.

31. RENNER. R. Untersuchungen über die NADH oxidase-aktivität der neutrophilen leucocyten. Helv. Paediat. Acta 24, 633 - 1969.

32. SBARRA.A., KARNOVSKI. M. The biochemical basis of phagocytosis, J. Biol. Chem. 234. 1355 - 1956.

33. SNEDECOR. G.W. Statistical methods applied to experiment in ag: culture and in biology. Iowa State college Press. Ames. Ioxa 1950.

34. STOSSEL. Th. Phagocytosis : The department of defense. New England. J. Medec. 14, 776 - 1972.

35. VALDES-DAPENA. M. Survey of Neonatal Deaths at Temple University Hospital, Exhibit at the American Academy of Pediatrics Meeting. April. 1964. Philadelphia.

36. VAUCHER. A., WISS. M., THEVOZ.F. KNOPFEL. M. et MIESCHER. P.A. La réduction du nitrobleu de tetra-zolium par les granulocytes dans divers états cliniques. Schweiz Med. Wschr. 100, 2.248, 1970.

37. WEHINGER.H., KIM.S., PRINGSHEIM.W. Modified N.B.T. test in premature infants. Lancet, I. 157 . 1971.

38. YOSHIDA. T., METCOFF. J., MORALES.M., ROSADO. A. et al. Human fetal growth retardation : energy metabolism in leucocytes. Pediatrics 50, 559. 1970.